Version 07/2024

MegaFLUO® BABESIA microti ad us. vet.

***In vitro* Diagnostikum**

Objektträger zum indirekten semiquantitativen Immunfluoreszenz-Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Babesia microti* im Plasma oder Serum von Nagern

GEBRAUCHSINFORMATION

DIAGNOSTIK MEGACOR
6912 Hörbranz – AUSTRIA

1. INFORMATIONEN ZUM TESTKIT

TESTKITKOMPONENTEN

1 Packung **MegaFLUO® BABESIA** microti enthält:
– 10 oder 50 Objektträger, beschichtet mit *Babesia microti*-Antigenen
– 1 Gebrauchsinformation

PROBENMATERIAL

Serum oder Plasma

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Die Lagertemperatur für die Objektträger beträgt **–20 °C**

Die Haltbarkeit beträgt 24 Monate ab Herstellung.

NOTWENDIGES, NICHT IM TESTKIT ENTHALTENES MATERIAL

FLUO FITC Anti-Nager-IgG-Konjugat, Positivkontrolle, Negativkontrolle, Eindeckmittel, PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) pH 7,2–7,4, Gefäß zum Waschen mit PBS, Reaktionsgefäße für Serumverdünnungen, Mikroliterpipetten, 24×50 mm Deckgläser, Fluoreszenzmikroskop mit Filtersystem für FITC (Fluoresceinisothiocyanat, Anregungswellenlänge 465–495, Grenzfilter 515–555) und 400× Vergrößerung, Brutschrank mit 37 °C, feuchte Kammer.

HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

2. TESTPRINZIP

Nagetierseren werden mit PBS (pH 7,2–7,4) entsprechend verdünnt und auf die Antigenfelder aufgebracht, um im Fall einer positiven Probe eine Antigen-Antikörperbindungsreaktion bei 37 °C zu ermöglichen. Durch anschließendes Spülen mit PBS werden nicht-gebundene, unspezifische Serumproteine abgewaschen. Im nächsten Schritt wird das fluoreszinmarkierte FLUO FITC Anti-Nager-IgG-Konjugat aufgebracht, welches an die Antigen-Antikörperkomplexe bindet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wird nicht-gebundenes Konjugat mit PBS abgespült. Abschließend werden die Antigenfelder mit Eindeckmittel und Deckglas abgedeckt. Die Beurteilung erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskop (Filtersystem für FITC) bei 400× Vergrößerung.

3. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Stellen Sie sicher, dass die exakte Zuordnung der Testkitkomponenten zum jeweiligen Patienten gewährleistet ist.
- Für jede Probe bzw. Verdünnung eine neue Pipettenspitze verwenden.
- Das Konjugat ist photosensitiv und wärmeempfindlich, deshalb sollte es bis kurz vor Testung in Dunkelheit bei 2–8 °C gelagert werden.
- Das Konjugat enthält Evans-Blau als Farbstoff, das potentiell krebserregend ist. Hautkontakt und Ingestion sind unbedingt zu vermeiden.
- Das Probenmaterial und die Objektträger müssen als potentiell infektiös angesehen werden und sind mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.

4. WICHTIGE ZUSATZINFORMATIONEN ZUR TESTAUSWERTUNG

Seroprävalenz

Der Cut-Off kann je nach Region sowie Probenherkunft (Abhängigkeit von der Prävalenz und des Endemie-Status) variieren. Daher wird jedem Labor empfohlen, den individuellen Cut-Off selbst festzulegen.

Eine akute Infektion (2- bis 4-facher Titeranstieg: „Serokonversion“) kann nur durch eine Titerbestimmung eines Serumpaars (2 Proben im Abstand von 2–3 Wochen) bestimmt werden.

Darüber hinaus sind die Testergebnisse grundsätzlich in Verbindung mit der Anamnese, der Klinik sowie mit zusätzlichen Laborparameter zu interpretieren.

Mögliche Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen mit Plasmodium-Spezies wurden dokumentiert. Kreuzreaktionen mit *Babesia divergens*, welche in Europa schwerere Infektionen verursachen, werden zur Zeit untersucht.

5. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Die Testkitkomponenten (außer Konjugat!) und die zu testenden Seren sollten zum Zeitpunkt der Anwendung Raumtemperatur haben.
2. Stellen Sie entsprechende Verdünnungen (z. B. 1:64 und 1:128) mit PBS für alle zu testenden Seren her. Für Seren, welche in einem früheren Test positiv beurteillt wurden, empfiehlt es sich, 2-fach-Serienverdünnungen mit PBS herzustellen, um den Endtiter (= höchste, noch positive Verdünnung) zu bestimmen.
3. Entnehmen Sie die Objektträger vorsichtig der Verpackung und legen Sie sie in die feuchte Kammer. Tragen Sie auf jeden Objektträger 1 Tropfen (20 µl) der Positiv- und Negativkontrolle auf separate Antigenfelder auf. Pipettieren Sie von jeder Serumverdünnung ebenfalls 20 µl auf separate Antigenfelder (Abb.1). Achten Sie darauf, dass die Antigenfelder vollständig benetzt sind.
4. Inkubieren Sie für 30 Minuten bei 37 °C.
5. Waschschritt: Klopfen Sie die Serumverdünnungen vorsichtig ab und schwenken Sie die Objektträger 5 Minuten in PBS. Wiederholen Sie den Schritt für weitere 5 Minuten in frischem PBS. Spülen Sie anschließend die Objektträger kurz mit dest. Wasser ab. Klopfen Sie vorsichtig überschüssiges Wasser ab und trocknen Sie gegebenenfalls vorsichtig die Teflonbeschichtung zwischen den Antigenfeldern mit saugfähigem Papier oder Wattestäbchen. Lassen Sie jedoch die Antigenfelder nicht austrocknen!
   Sollten Sie zum Waschen eine Spritzflasche verwenden, richten Sie den Strahl nicht direkt auf die Antigenfelder.
6. Legen Sie die Objektträger zurück in die feuchte Kammer und tragen Sie sofort auf jedes verwendete Antigenfeld 1 Tropfen FLUO FITC Anti-Nager-IgG-Konjugat auf (Abb.2). Achten Sie darauf, dass die Antigenfelder vollständig benetzt sind.
7. Inkubieren Sie für 30 Minuten bei 37 °C und in Dunkelheit, um das photosensitive Konjugat zu schützen.
8. Wiederholen Sie den Waschschritt, wie in Punkt 5 beschrieben.
9. Geben Sie einige Tropfen Eindeckmittel auf Deckgläser und legen Sie diese vorsichtig auf die Objektträger. Versuchen Sie, etwaige Luftblasen vorsichtig herauszudrücken.
10. Werten Sie die Objektträger im Fluoreszenzmikroskop bei 400× Vergrößerung aus (Abb.3), indem Sie die Fluoreszenzmuster der Proben mit denen der Positiv- bzw. Negativkontrolle vergleichen.
11. Versiegelte Objektträger können bei 2–8 °C im Dunkeln bis zu 7 Tage aufbewahrt werden.

6. TESTAUSWERTUNG

Für die Auswertung wird ein Fluoreszenzmikroskop mit einem Filtersystem für FITC (Anregungswellenlänge 465–495, Grenzfilter 515–555) und einer Vergrößerung von 400× benötigt.

Die Fluoreszenzbilder (Form, Dichte etc.) der Negativ- und Positivkontrolle gelten grundsätzlich als Referenzbilder. Davon abweichende Reaktionsmuster sind als unspezifisch, sprich negativ zu bewerten!

Positives Fluoreszenzbild ≥ 1:64

Es sind helle, deutlich erkennbare, regelmäßig gefärbte und scharf abgegrenzte Einschlusskörperchen (Merozoiten/Trophozoiten) im Zytoplasma (oder, bei geplatzten Erythrozyten, außerhalb) infizierter Erythrozyten erkennbar.

Es empfiehlt sich, positive Proben weiter zu verdünnen, um den Endtiter (= höchste, noch positive Verdünnung) zu bestimmen.

Cut-Off-Fluoreszenzbild / Empfohlener Cut-Off 1:64

Die Einschlusskörperchen zeigen eine geringe (1+) gelbgrüne Fluoreszenz.

Negatives Fluoreszenzbild < 1:64

Die Einschlusskörperchen zeigen keine gelbgrüne Fluoreszenz, sie sind rötlich bis grau oder sind nicht mehr erkennbar.

Abweichende fluoreszierende Reaktion:

Reaktionsmuster, die sich von denen der Positivkontrolle unterscheiden, sind als unspezifische Reaktionen und daher als negativ zu bewerten.

Abbildungen finden Sie unter www.megacor.at

SYMBOLERKLÄRUNG

–20 °C	Lagerung – siehe Etikett
	Für den tierärztlichen Gebrauch
	In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsinformation genau beachten
	Verwendbar bis – siehe Etikett
LOT	Chargen-Bezeichnung
!	Keine Reagenzien verschiedener Testkits, Chargennummern oder mit abgelaufenem Verfallsdatum verwenden.

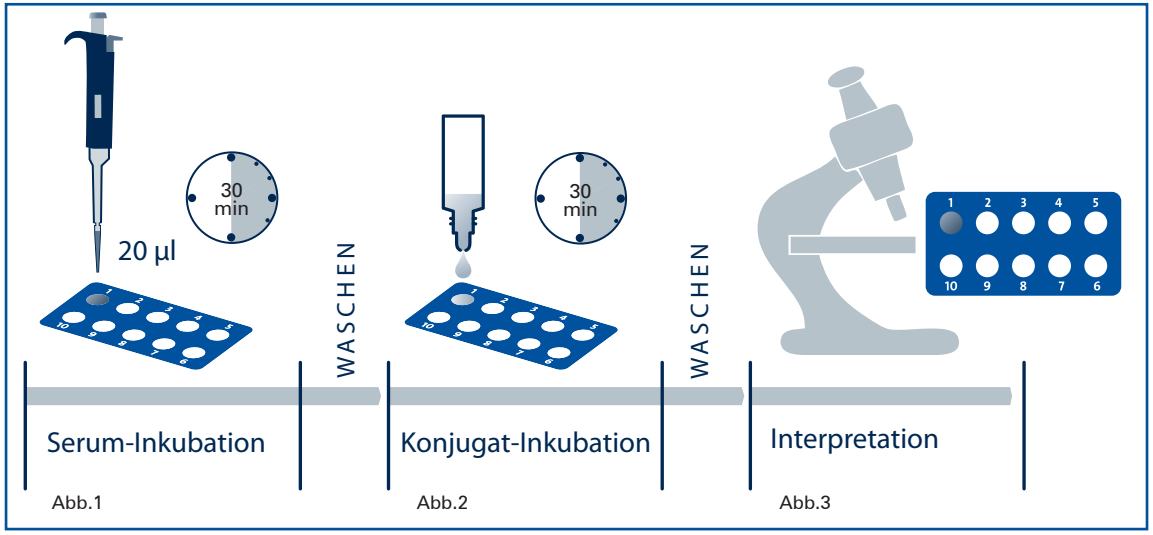

Abb.1 Abb.2 Abb.3

Version 07/2024

MegaFLUO® BABESIA microti ad us. vet.

***In vitro* diagnosticum**

Slides for the indirect semiquantitative immunofluorescence detection of specific IgG antibodies against *Babesia microti* in plasma or serum of rodents

INSTRUCTIONS FOR USE

DIAGNOSTIK MEGACOR
6912 Hörbranz – AUSTRIA

1. INFORMATION ON THE TEST-KIT

TEST-KIT COMPONENTS

1 package **MegaFLUO® BABESIA** microti contains:
– 10 or 50 slides coated with *Babesia microti* antigens
– 1 instructions for use

SAMPLE MATERIAL

Serum or plasma

STORAGE AND STABILITY

The storage temperature for the slides is **–20 °C**

Shelf life: 24 months after manufacturing.

MATERIAL REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

FITC anti-rodent IgG conjugate, Positive Control, Negative Control, Mounting Medium, PBS (phosphate buffered saline) pH 7.2–7.4, washbasin for PBS, test tubes for serum dilutions, microlitre pipettes, 24×50 mm cover slips, fluorescence microscope with filter system for FITC (fluorescein isothiocyanate, excitation wavelength 465–495, barrier filter 515–555) and 400× magnification, 37 °C incubator, humid chamber.

LIABILITY

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the use of this product.

2. TEST PRINCIPLE

Rodent sera are diluted in PBS (pH 7.2–7.4) and dropped onto the slide wells to allow an antigen-antibody reaction at 37 °C in the case of a positive sample. By subsequent washing with PBS, non-bound unspecific serum proteins are washed off. In the next step, fluorescin-marked FLUO FITC anti-rodent IgG conjugate is added which binds to the antigen-antibody complexes. After an incubation time of 30 minutes, non-bound conjugate is washed off with PBS. Finally, the wells are covered with Mounting Medium and cover slip. Evaluation is done with a fluorescence microscope (filter system for FITC) with 400 × magnification.

3. PRECAUTIONS FOR USERS

- Make sure that the test-kit components can be correlated exactly to the particular patient.
- Use a new pipette tip for each sample or dilution.
- The conjugate is photosensitive and sensitive to heat, therefore it should be stored in the dark at 2–8 °C.
- The conjugate contains Evans-blue dye, which is potentially carcinogenic. Avoid ingestion and skin contact.
- The sample material and the slides must be seen as potentially infectious and disposed of accordingly after test procedure, together with the used test-kit components.

4. IMPORTANT ADDITIONAL INFORMATION FOR TEST EVALUATION

Seroprevalence

The cut-off can vary depending on the region and the origin of the sample (dependent on the prevalence and on the state of endemicity). Therefore, it is recommended for every laboratory to determine an individual cut-off.

An acute infection (2- to 4-fold titre increase: "seroconversion") can only be determined by the titre determination of a coupled serum test (2 samples in an interval of 2–3 weeks).

The interpretation of test results should always be based on anamnestic and especially clinical data and additional laboratory parameters.

Possible cross reactions

Cross reactions with Plasmodium spp has been documented. Cross reactions with *Babesia divergens,* which causes a more severe infection in European patients, is currently under investigation.

5. TEST PROCEDURE

1. The test-kit components (apart from conjugate!) and the sera to be tested should have room temperature at the time of application.
2. Prepare appropriate dilutions (e. g. 1:64 and 1:128) with PBS for all sera to be tested. For sera found positive on a previous test it is recommended to prepare serial two-fold dilutions in PBS to determine the endpoint titre (= highest dilution that is still positive).
3. Carefully remove the slides from their foil pouch shortly before use and place them into the humid chamber. Apply 1 drop (20 µl) of the Positive and Negative Control on each slide on separate antigen wells. Pipette 20 µl of every serum dilution on separate antigen wells (fig.1). Take care that the antigen wells are completely covered.
4. Incubate for 30 minutes at 37 °C.
5. Washing step: Tap remaining serum dilutions gently from the slides and shake the slides gently for 5 minutes in PBS. Repeat this step for another 5 minutes with fresh PBS. Briefly rinse the slides with distilled water. Tap remaining water gently from the slides and, if necessary, dry the teflon mask between the wells with absorbent paper or cotton bud sticks. However, do not allow the antigen wells to dry out!

   If using a washing bottle, do not focus the stream directly onto the antigen wells!
6. Place the slides back into the humid chamber and immediately drop 1 drop of FLUO FITC anti-rodent IgG conjugate onto each used well (fig.2). Take care that the antigen wells are completely covered.
7. Incubate for 30 minutes at 37 °C and in the dark to protect the photosensitive conjugate.
8. Repeat washing step as described in step 5.
9. Add some drops of Mounting Medium on the cover slips and place them carefully on the slides. Try to remove any possible bubbles carefully.
10. Evaluate the slides using a fluorescence microscope at 400× magnification (fig.3), comparing each well to the fluorescence pattern seen in the Positive and Negative Controls.
11. Sealed slides can be stored at 2–8 °C in the dark for up to 7 days.

6. TEST EVALUATION

For the evaluation, a fluorescence microscope with a filter system for FITC (excitation wavelength 465–495, barrier filter 515–555) and 400× magnification is required.

The fluorescence pattern (form, density etc.) of the Negative and Positive Control is considered as reference pattern. Patterns of reactivity different than that seen in the Controls must be considered non-specific, which means negative!

Positive fluorescence pattern ≥ 1:64
Bright, sharp, regular stained inclusion bodies (merozoites and trophozoites) are seen in the cytoplasm (or outside in case of burst erythrocytes) of infected erythrocytes.

A further dilution of the positive samples is recommended to determine the endpoint titre (= highest dilution that is still positive).

Cut-off fluorescence pattern / recommended cut-off 1:64
The inclusion bodies show a weak (1+) yellow-green fluorescence.

Negative fluorescence pattern < 1:64
The inclusion bodies do not show any yellow-green fluorescence, they appear greyish-red or are no longer visible..

Divergent fluorescent reaction
Reaction patterns different than those seen in the Positive Control must be considered as non-specific reactions and therefore as negative.

Images are shown at www.megacor.at

EXPLANATION OF SYMBOLS

- Store at –20 °C – see label
- For veterinary use only
- *In vitro* diagnosticum
- Follow instructions for use precisely
- Expiry date – see label
- LOT Lot number
- ! Do not use test-kit components from different kits, lot numbers or beyond stated expiry date.

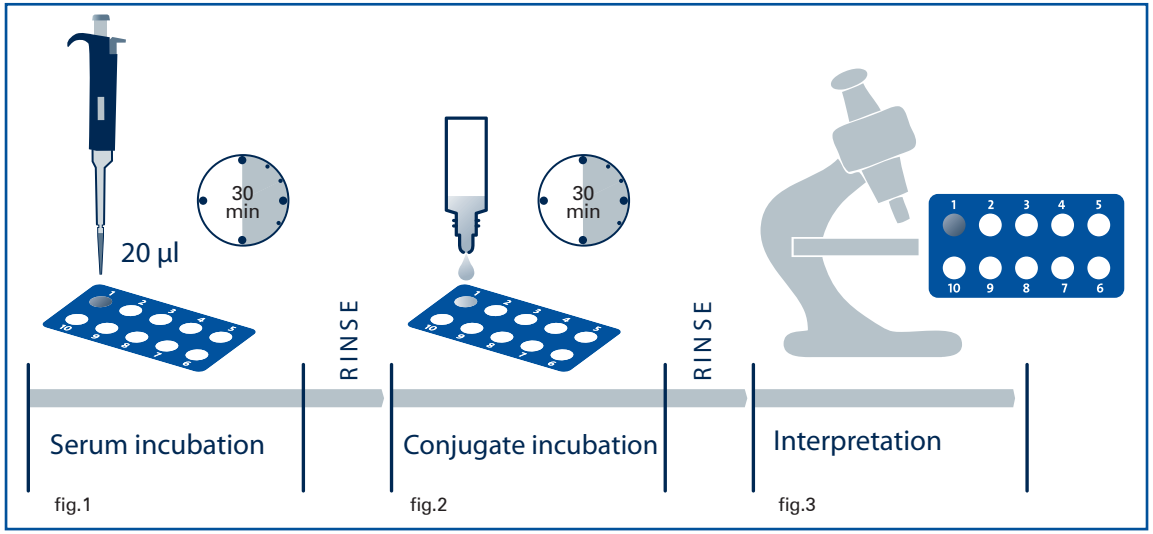

fig.1 fig.2 fig.3